

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成 29 年 7 月 20 日 (2017.7.20)

【公表番号】特表 2016-528894 (P2016-528894A)

【公表日】平成 28 年 9 月 23 日 (2016.9.23)

【年通号数】公開・登録公報 2016-056

【出願番号】特願 2016-530062 (P2016-530062)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 9/16 (2006.01)

C 1 2 P 19/34 (2006.01)

C 1 2 N 7/00 (2006.01)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 9/16 Z

C 1 2 P 19/34 A

C 1 2 N 7/00

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 0 7 K 19/00

【手続補正書】

【提出日】平成 29 年 6 月 8 日 (2017.6.8)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標的 DNA に相補的な ガイド RNA と共局在複合体を形成し且つ部位特異的に前記標的 DNA を切断する C a s 酵素、を 含む 幹細胞内で、前記標的 DNA を改変する方法であって、前記方法は、

前記標的 DNA に相補的であり前記 C a s 酵素を前記標的 DNA まで誘導 (guide) する ガイド RNA、をコードする第 1 外来性核酸を、前記幹細胞に導入すること；ここで前記 ガイド RNA および前記 C a s 酵素は前記標的 DNA に対する共局在複合体のメンバーである、

ドナー核酸配列を前記幹細胞に導入すること、

を含み、

前記 ガイド RNA および前記 C a s 酵素が前記標的 DNA に共局在し、前記 C a s 酵素が前記標的 DNA を切断し、前記ドナー核酸配列が前記標的 DNA に挿入されて前記幹細胞内で改変 DNA を産生する、前記方法。

【請求項 2】

前記 C a s 酵素が C a s 9 である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記ガイドRNAが10ヌクレオチド～500ヌクレオチドである、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記ガイドRNAが20ヌクレオチド～100ヌクレオチドである、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記ガイドRNAがtracrRNA-crRNA融合体である、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記標的DNAがゲノムDNA、ミトコンドリアDNA、ウイルスDNA、または外来性DNAである、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記ドナー核酸配列が相同組換えにより挿入される、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記ドナー核酸配列が非相同末端結合により挿入される、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記Cas酵素または前記ガイドRNAが、前記幹細胞によって発現される外来性核酸として前記幹細胞に導入される、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 10】

複数のドナー核酸および複数のガイドRNAを導入して、前記幹細胞内で前記標的DNAに複数の改変を生じさせることをさらに含む、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 11】

幹細胞内で改変DNAを作製した後に、前記Cas酵素をコードする核酸が、前記幹細胞のゲノムから除去される、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記ガイドRNAが、前記幹細胞の周囲の媒体から前記幹細胞内へと導入される、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 13】

前記ガイドRNAが5'キャップ構造を含む、請求項12に記載の方法。

## 【請求項 14】

前記ガイドRNAがホスフェート基を欠く、請求項12に記載の方法。

## 【請求項 15】

前記ガイドRNAが前記幹細胞の周囲の媒体から連続的に供給される、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 16】

前記幹細胞は、前記Cas酵素をコードする核酸を含み且つ酵素により除去可能なベクターまたはカセットを前記幹細胞のゲノムDNAに挿入することにより、遺伝的に改変されている、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 17】

前記ベクターがPiggybacベクターである、請求項16に記載の方法。

## 【請求項 18】

前記Cas酵素をコードする核酸が、酵素を用いて除去される、請求項16に記載の方法。

## 【請求項 19】

前記Cas酵素をコードする核酸を含む前記酵素により除去可能なベクターまたはカセットは、酵素を用いて除去される、請求項16に記載の方法。

## 【請求項 20】

前記Cas酵素をコードする核酸を含む前記酵素により除去可能なベクターまたはカセットは、酵素を用いて挿入される、請求項16に記載の方法。

## 【請求項 2 1】

前記 Cas 酵素をコードする核酸を含む前記酵素により除去可能なベクターまたはカセットは、トランスポゼースを用いて除去される、請求項 1 6 に記載の方法。

## 【請求項 2 2】

前記 Cas 酵素をコードする核酸は誘導可能である、請求項 1 6 に記載の方法。

## 【請求項 2 3】

前記 Cas 酵素をコードする核酸は、ドキシサイクリン誘導性プロモータの影響下にある、請求項 1 6 に記載の方法。

## 【請求項 2 4】

前記 Cas 酵素をコードする核酸は、ドキシサイクリンを用いて誘導可能である、請求項 1 6 に記載の方法。

## 【請求項 2 5】

標的 DNA に相補的なガイド RNA と共局在複合体を形成し且つ部位特異的に前記標的 DNA を切断する Cas 酵素、をコードする第 1 外来性核酸を含む、幹細胞。

## 【請求項 2 6】

前記標的 DNA に相補的であり前記 Cas 酵素を前記標的 DNA まで誘導 (guide) するガイド RNA、をコードする第 2 外来性核酸をさらに含み、前記ガイド RNA および前記 Cas 酵素が前記標的 DNA に対する共局在複合体のメンバーである、請求項 2 5 に記載の幹細胞。

## 【請求項 2 7】

ドナー核酸配列をコードする第 3 外来性核酸をさらに含む、請求項 2 6 に記載の幹細胞。

## 【請求項 2 8】

前記 Cas 酵素の発現を促進するための誘導性プロモーターをさらに含む請求項 2 5 に記載の幹細胞。

## 【請求項 2 9】

前記第 1 外来性核酸が前記幹細胞のゲノム DNA からトランスポゼースを使用して除去可能である、請求項 2 5 に記載の幹細胞。

## 【請求項 3 0】

前記 Cas 酵素が Cas 9 である、請求項 2 5 に記載の幹細胞。

## 【請求項 3 1】

前記ガイド RNA が 10 ヌクレオチド ~ 500 ヌクレオチドである、請求項 2 5 に記載の幹細胞。

## 【請求項 3 2】

前記ガイド RNA が 20 ヌクレオチド ~ 100 ヌクレオチドである、請求項 2 5 に記載の幹細胞。

## 【請求項 3 3】

前記ガイド RNA が tracrRNA - crRNA 融合体である、請求項 2 5 に記載の幹細胞。

## 【請求項 3 4】

前記標的 DNA がゲノム DNA、ミトコンドリア DNA、ウイルス DNA、または外来性 DNA である、請求項 2 5 に記載の幹細胞。